Histochemische Untersuchungen zur Verteilung von Dehydrogenasen in Ascites-Tumoren und ihren subcutanen Implantaten

von

HANS VERSMOLD

München 1962

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

Histochemische Untersuchungen zur Verteilung von Dehydrogenasen in Ascites-Tumoren und ihren subcutanen Implantaten.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans Versmold
aus Münster/Westf.

München 1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Eder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Büngeler

Dekan: Prof. Dr. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.XI.1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material	2
III.	Methodik	3
IV.	Befunde	5
	A. Ascites	5
	Ehrlich'scher Mäuse-Ascites-Tumor	5
	Walker-Carcinom der Ratte	6
	Yoshida-Sarkom der Ratte	8
	B. Subcutanes Implantat	8
	Ehrlich'scher Mäuse-Ascites-Tumor	8
	Walker-Carcinom der Ratte	14
	Yoshida-Sarkom der Ratte	17
	C. Modellversuche	18
V.	Besprechung	19
VI.	Zusammenfassung	25
VII.	Literaturverzeichnis	26
VIII.	Lebenslauf	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0006

I. Einleitung

Seit Warburg 1926 (58) in seiner grundlegenden Arbeit über den Kohlehydratstoffwechsel von Tumoren eine abnorme Steigerung der Glykolyse im Tumorgewebe als den wesentlichsten Unterschied zum normalen Gewebe beschrieben hat, ist die biochemische Untersuchung des Kohlehydratabbaus im Geschwulstgewebe schon früh in den Mittelpunkt der experimentellen Krebsforschung gerückt (6, 8).

Biochemische Messungen der Dehydrogenase-Aktivitäten in verschiedenen Geweben, auch malignen Tumoren folgten bald. Elliot, Benoy und Baker (13) beobachteten eine verminderte Aktivität der Lactat-Dehydrogenase im Walker-Carcinom 256. Euler, Adler und Günther (14) fanden in dialysierten Extrakten von Jensen-Sarkom eine erhöhte Aktivität dieses Fermentes. Nach Untersuchungen von Meister (39) an primären und transplantierten Geschwülsten unter Anwendung einer spektrophotometrischen Methode ist die Lactatdehydrogenase-Aktivität der einzelnen Tumoren jedoch gleich und entspricht den Befunden an normalen Geweben. Breusch (4) beschrieb erstmals eine verminderte Aktivität der Succinodehydrogenase in verschiedenen experimentellen Tumoren. Nach Wenner, Spirtes und Weinhouse (59) entsprechen die Aktivitäten der Dehydrogenasen des Citronensäurezyklus in transplantierten Tumoren denjenigen normaler Gewebe. Nur die Succinodehydrogenase-Aktivität ist im Tumorgewebe vermindert. Einen zusammenfassenden Bericht über die Tumor-Enzymologie geben Greenstein und Meister (20, 21). Diese biochemischen Untersuchungen ermöglichten zwar eine quantitativ exakte Aussage. Sie ließen aber, da sie an Gewebshomogenaten durchgeführt werden mußten, keinen Schluß auf die morphologische Verteilung der Fermente innerhalb eines Gewebes zu.
Tetrazoliumsalze, 1894 von Pechman und Runge (46) synthetisiert, wurden von Kuhn und Jerchel (28, 29) erstmals als Elektronenacceptoren zum Nachweis biologischer Oxydationsvorgänge verwandt. Sie hatten gegenüber dem Methylenblau den Vorteil, daß die oxydierte Stufe farblos und wasserlöslich ist, die reduzierte Stufe,

das Formazan, ein wasserunlöslicher Farbstoff (47). Von Kun und Abood (31) wurden die Tetrazoliumsalze als Dehydrogenase-Indikatoren eingeführt und fanden bald steigende Beachtung in biochemischen (1, 26, 56) und histochemischen (15, 16, 22, 23, 24, 45, 47, 50, 51, 52, 54, 55) Untersuchungen.
Durch die Entwicklung neuer Tetrazoliumverbindungen, des 2,2'-di-p-nitro-phenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylen)-ditetrazoliumchlorid (Nitro BT), des 3-(4,5-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl-terazoliumbromid (MTT) und anderer (43, 44, 45, 57)ist die intrazelluläre Darstellung der DPN- (44, 47, 48) und TPN-Diaphorase (44, 45, 48) der Succino-dehydrogenase (43, 45) und der DPN- und TPN-abhängigen Dehydrogenasen (23, 45) möglich geworden.
Damit war die Voraussetzung geschaffen, Wachstumsprozesse von Tumoren in ihren verschiedenen Erscheinungsformen mit der Verteilung der Fermentaktivitäten innerhalb des Tumors zu vergleichen. Eder, Schauer und Wrba (10) beobachteten, daß in verschiedenen Ascites-Tumoren nicht alle Zellen positive Fermentreaktionen ergeben, sondern, daß ein Teil fermentnegativ ist. Das Yoshida-Sarkom zeigte in allen untersuchten Dehydrogenasen geringere Aktivität als das Walker-Carcinom.

Besonders interessant schien in diesem Zusammenhang die Klärung der Frage des Verhaltens der Fermente bei der Überführung von Ascites-Tumoren in die solide Form, und die Untersuchung der Aktivitäten bei verschiedenen Altersstufen der Tumoren. Diese Untersuchungen sind der Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Teilergebnisse hierzu sind bereits veröffentlicht (Eder, Wrba, Versmold und Schauer (11), Eder und Wrba (12)).

II. Material

Für die Untersuchungen wurden verwendet:

a) Eine institutseigene Linie des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumors (35), der auf 22 (18 - 24) g schwere Händler-Mäuse über-

impft wurde.

) Die Linie MR - RM (63) und die colchizinresistente Linie CR (61) des Walker-Ascites-Tumors, der 130 - 150 g schweren Sprague-Dawley-Ratten überimpft wurde.

) Der Yoshida-Ascites-Tumor RY (34, 64), der auf 130 - 150 g schwere Sprague-Dawley-Ratten überimpft wurde.

III. Methodik

er Walker-Ascites-Tumor wurde auf 31 Ratten i.p. überimpft und om 1. - 25. Tag nach der Transplantation zur Untersuchung entommen.

er Ehrlich'sche Mäuse-Ascites-Tumor wurde auf 18 Mäuse i.p. berimpft und, entsprechend dem schnelleren Wachstum dieses Tuors, vom 1. - 13. Tag nach der Transplantation entnommen.

lle Tiere wurden zwischen 11^{00} und 12^{00} Uhr getötet.
ur Gewinnung von Tumorzellen am 1. Tag nach der Überimpfung wurde eine i.p. Spülung mit Ringerlösung durchgeführt. Der Tumorscites wurde in Ringerlösung aufgefangen, gewaschen und zentrifugiert. An dem Zentrifugat wurden folgende Enzymreaktionen durchgeführt:

) Lactat-Dehydrogenase nach Hess, Scarpelli und Pearse (23).
Substrat: Na-dl-Lactat. Incubationszeit: 30 min.
Temperatur: 37^{o} C.

) Äpfelsäuredehydrogenase nach Hess, Scarpelli und Pearse (23).
Substrat: Na-l-maleat. Incubationszeit: 30 min.
Temperatur: 37^{o} C.

) α-Glycerophosphatdehydrogenase nach Hess, Scarpelli und Pearse (23). Substrat: Na-dl-α-Glycerophosphat. Incubationszeit: 30 min.
Temperatur: 37^{o} C.

d) Succinodehydrogenase nach Nachlas, Tsou, Souza, Cheng und Seligman (43). Substrat: Na-Succinat. Incubationszeit: 30 min. Temperatur: 37° C.
Kontrollreaktionen nach Dean, Barnett und Seligman (7).

e) DPN-Diaphorase nach Scarpelli, Hess und Pearse (48).
Substrat: Reduziertes Diphosphopyridinnucleotid (DPN-H).
Incubationszeit: 15 min. Temperatur: 37° C.

f) TPN-Diaphorase nach Scarpelli, Hess und Pearse (48).
Substrat: Reduziertes Triphosphopyridinnucleotid (TPN-H).
Incubationszeit: 15 min. Temperatur: 37° C.

Von allen Reaktionen wurden je 3 Ausstriche in Glyceringelatine eingebettet und zur quantitativen Beurteilung aus jedem Ausstrich 1000 Zellen ausgezählt. Die Leukocytenzahlen und der Mitoseindex wurden an Kontrollausstrichen mit Feulgen-Färbung bestimmt.

In drei Versuchsserien wurde Tumorascites des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumors 7 - 11 Mäusen, in zwei Serien je 6 Ratten subcutan injiziert. Der Walker-Tumor MR-RM wurde einmal auf 12 Ratten, der Walker-Tumor CR zweimal auf je 10 Ratten und das Yoshida-Sarkom RY dreimal auf 7 - 10 Ratten übertragen.
Mäusen wurde 0,2 ccm, Ratten 0,3 - 0,5 ccm injiziert.
Die Tiere wurden nach 5, 15, 30 min., 1, 3, 4, 6, 21-24, 48 Std., 3, 5, 7 und 9 Tagen getötet. An Kryostatserienschnitten des Tumors wurden die oben aufgeführten Fermentreaktionen durchgeführt und H.E.- und Fettfärbungen (Sudan III) angefertigt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Gefriertrocknung auf den Ausfall der Dehydrogenasereaktionen wurde der Tumor-Ascites von 5 Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumoren, 5 Walker-Carcinomen und 3 Yoshida-Sarkomen der Ratte jeweils mit Kohlensäureschnee (-70°C) überfallgefroren, bei -20° C gelagert und nach 5, 30, 60 min., 2, 3, 9, 24 und 48 Std. wiederaufgetaut und histochemisch untersucht.

IV. Befunde

A. Ascites

In allen verwendeten Ascites-Tumoren finden sich stets nur in einem Teil der Zellen positive Dehydrogenasereaktionen, die in ihrer Intensität sehr unterschiedlich sind. Es ließen sich Unterschiede zwischen den untersuchten Tumorstämmen feststellen und durch Auszählungen objektivieren.

Ehrlich'scher Mäuse-Ascites-Tumor.

Die Succinodehydrogenasereaktion ist in durchschnittlich 13,5 % (0,5 - 35) der Zellen positiv. Sie und die DPN-Diaphorase-Reaktion zeigt einen gleitenden Übergang von stark positivem bis zu völlig negativem Ausfall in den Zellen. Bei den Reaktionen für Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α -Glycerophosphatdehydrogenase finden sich dagegen neben stark fermentpositiven nur fermentnegative Zellen. Blaßviolette Übergangsfarbtöne wie bei der Diaphorase oder der Succinodehydrogenase fehlen hier. Einzelne schwach positive Zellen sind durch eine deutliche Blaufärbung weniger Granula im Cytoplasma eindeutig gekennzeichnet.
Für alle Fermente in ähnlicher Weise ist die positive Fermentreaktion in vielen Zellen als ein gleichmäßiger, schmaler, blauer Farbring an der Zellmembran lokalisiert. Oder es finden sich dicht an der Zellmembran, oft auch über das ganze Cytoplasma verteilt zahlreiche fermentpositive Granula von der Grössenordnung 0,5μ . Häufig, besonders in größeren Zellen sind die fermentpositiven Granula im Cytoplasma neben dem meist excentrisch gelagerten Zellkern der Zellmembran in Form einer Sichel oder eines Halbmondes angelagert. In manchen Präparaten ist eine granuläre Anordnung der Fermentreaktion nur verwischt zu erkennen. Es herrscht eine diffuse Blaufärbung des gesamten Cytoplasmas oder, wie oben beschrieben, halbmondförmiger Anteile vor.

Eine positive Lactatdehydrogenasereaktion findet sich in durchschnittlich 6,9 % (2 - 12 %; zwei Fälle 25 %, 23 %) der Zellen.

Bei 4 % der positiven Zellen ist die Reaktion nur schwach ausgefallen, in den übrigen stark. Eine entsprechende Verteilung zeigen die Äpfelsäuredehydrogenase mit durchschnittlich 3,3 % (1,5 - 5,3) und die α-Glycerophosphathydrogenase mit durchschnittlich 4,7 % (2 - 8,5) positiven Zellen.
Der Gehalt an Leukocyten eines Ehrlich'schen Ascites-Tumors ist so gering, daß sie bei der Auswertung der Zählungen vernachlässigt werden konnten.
Eine Beziehung zwischen der Zeit der i.p. Passage, also dem Alter des Ehrlich'schen Ascites-Tumors und der Zahl der fermentpositiven Geschwulstzellen ließ sich nicht nachweisen.
Für die Lactatdehydrogenase sind die Ergebnisse in Abb. 1 dargestellt.

Walker-Carcinom der Ratte.

Die DPN-Diaphorase- und die Succinodehydrogenase-Reaktion zeigen die gleichen Befunde wie beim Ehrlich'schen Tumor der Maus und lassen keine zahlenmäßig exakte Aussage zu. Eine positive Succinodehydrogenase-Reaktion findet sich in 2,5 - 95 % der Ascitestumorzellen. Die Grenze zwischen noch negativen und schon positiven Zellen ist nicht immer zu bezeichnen. Auch bei den Reaktionen auf Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase ist die Grenze zwischen stark positiven und negativen Zellen nicht so scharf, wie beim Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor. Von den durchschnittlich 6,5 % (0,7 - 15,5) Lactatdehydrogenase-positiven Zellen zeigen 20 % eine nur schwache Reaktion. Ein entsprechendes Verhältnis ergibt sich auch bei der Äpfelsäuredehydrogenase und der α-Glycerophosphatdehydrogenase. An 3 untersuchten Tumoren ließ sich keine TPN-Diaphorase nachweisen.

Für diese Befunde käme als Fehlerquelle in Betracht, daß bei den Auszählungen die Leukocyten nicht berucksichtigt wurden. Gesonderte Auszählungen an H.E.- und Feulgen-gefärbten Ausstrichen ergaben, daß die Ergebnisse um 0,oo3 - 15 % der Gesamtschwankungsbreite verfälscht sind. Eine signifikante Änderung

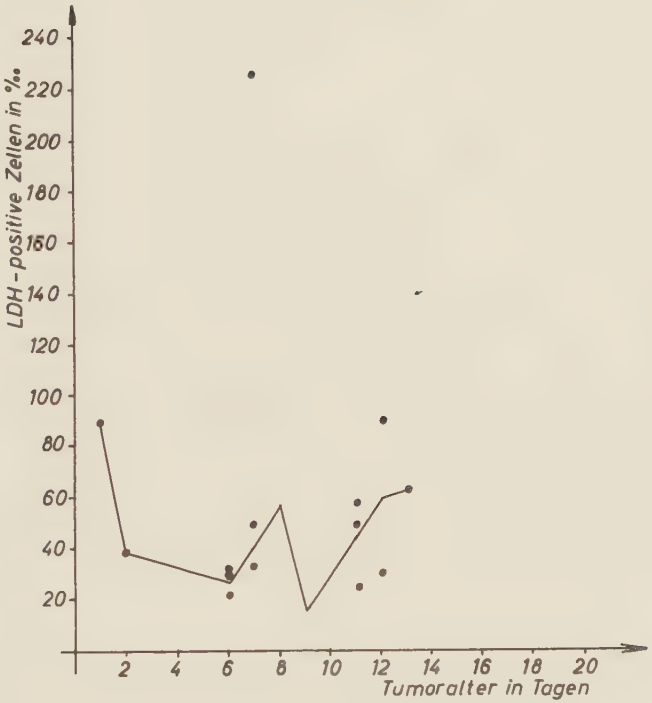


Abb. 1. Darstellung der Anzahl Lactatdehydrogenase-positiver Zellen des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumors bezogen auf 1000 Tumorzellen in Abhängigkeit vom Alter des Tumors nach der i.p. Injektion. Jeder Punkt entspricht dem Durchschnitts-Wert aus Zählungen von 3 x 1000 Zellen eines Tumors. Die Kurve verbindet die Mittelwerte aller Tumoren gleichen Alters.

des Ergebnisses ergibt sich bei der Umrechnung der einzelnen Werte nicht.

Eine zunächst beobachtete Verminderung der Lactatdehydrogenase- und Äpfelsäuredehydrogenase-positiven Zellen mit steigendem Alter des Walker-Carcinoms der Ratte ließ sich in weiteren Versuchsserien nicht

bestätigen (Abb. 2). Eine Beziehung zwischen der Mitoserate (0,1 - 5 %) und der Anzahl fermentpositiver Zellen besteht nicht.

Yoshida-Sarkom der Ratte.

Bei diesem Ascites-Tumor sind die histochemischen Fermentreaktionen beträchtlich schwächer und die Zahl der fermentpositiven Zellen niedriger als in den beiden oben beschriebenen Tumoren. Die Verteilung der Reaktionsstärken der DPN-abhängigen Dehydrogenasen entspricht dem Walker-Carcinom der Ratte. Auch hier ist der Übergang von fermentpositiven zu -negativen Zellen gleitend.

Die intrazelluläre Lokalisation der Fermentreaktionen beim Yoshida-Sarkom und beim Walker-Carcinom der Ratte gleicht den Befunden am Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor.

Auch beim Yoshida-Sarkom ließen sich keine Beziehungen zwischen dem Entwicklungsalter des Tumors und der Zahl der fermentpositiven Zellen nachweisen.

B. Subcutanes Implantat.

Nach der subcutanen Injektion der Standardmenge an Tumor-Ascites zur Erzeugung solider Geschwülste liegen bei den drei untersuchten Tumoren die Geschwulstzellen in einer Blase dicht zusammen in der Subcutis. Die Ascitesflüssigkeit mit einigen Geschwulstzellen verteilt sich im umgebenden Bindegewebe, das hierdurch hochgradig ödematös aufgequollen ist. Um den Tumor finden sich bald in kapselartiger Anordnung Fibrocyten.

Ehrlich'scher Mäuse-Ascites-Tumor.

5 - 15 min. nach der Implantation der Geschwulstzellen zeigt sich eine histochemische Reaktion, die gegenüber den Befun-

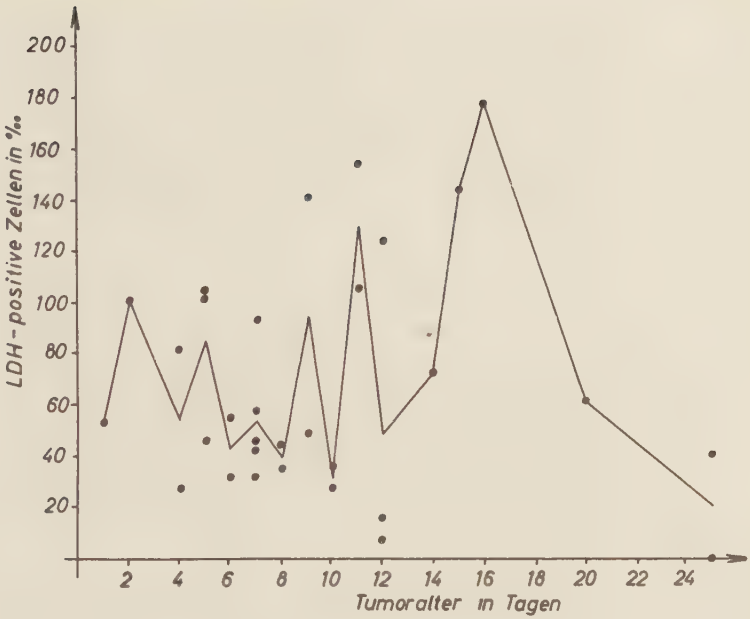
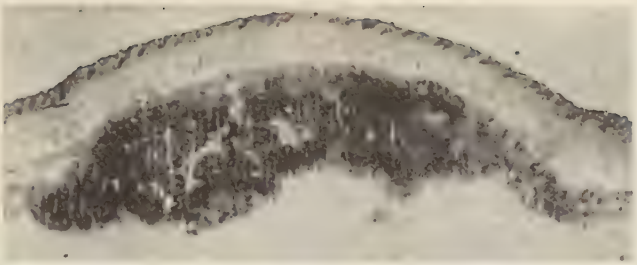


Abb. 2. Darstellung der Anzahl Lactatdehydrogenase-positiver Zellen des Walker-Carcinoms CR der Ratte bezogen auf 1000 Tumorzellen in Abhängigkeit vom Alter des Tumors nach der i.p. Injektion. (Legende s. Abb. 1).

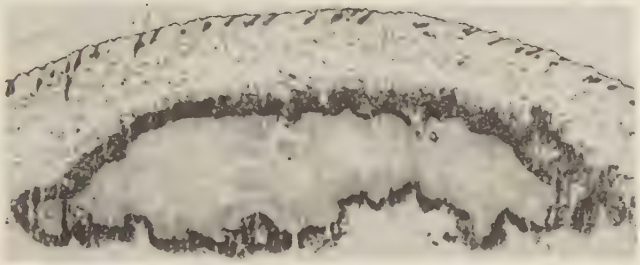
den am Ascites deutlich verändert ist. In den untersuchten Kryostatschnitten zeigen alle Geschwulstzellen gleichmäßig eine intensiv positive Reaktion für Lactatdehydrogenase (Abb. 3 a). Schwächer, aber auch in allen Zellen positiv sind die Reaktionen für Äpfelsäuredehydrogenase, α-Glycerophosphatdehydrogenase, DPN-Diaphorase und Succinodehydrogenase.
Die intrazelluläre Lokalisation der Fermentreaktionen entspricht den Befunden an Asciteszellen.

Auf die Frage der Änderung der histochemischen Reaktion der Tumorzellen wird an anderer Stelle eingegangen.
Das Implantat liegt 4 - 6 Std. nach der Injektion als dichter Geschwulstzellknoten inmitten ödematös aufgequollenen Bindegewebes. Zu diesem Zeitpunkt treten die ersten morphologischen und fermenthistochemischen Veränderungen auf. Das Implantat gliedert sich in zwei Anteile. Eine Randzone von der Schichtdicke zwischen 5 und 20 Zellen besteht aus großen Geschwulstzellen mit großem Zelleib und Zellkern. Im zentralen Anteil des Tumors finden sich Geschwulstzellen mit kleinerem Cytoplasmaleib und kleinerem Zellkern mit dicht gefärbtem Chromatingerüst. Mitosen finden sich in der Außenzone und im Zentrum (vgl. Abb. 3a, 4a).
Dieser morphologischen Differenzierung entsprechen die fermenthistochemischen Befunde. Die Randzone zeigt eine intensive ringförmige Reaktion für die Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase (Abb. 3 b u. d, Abb. 4 b) die gegen den zentralen Anteil des Tumors scharf abgegrenzt ist. Die stark positive DPN-Diaphorase-Reaktion findet sich auch vorwiegend in der Randzone. Sie ist jedoch nach innen nicht scharf begrenzt, sondern ihre Intensität nimmt gegen das Geschwulstzentrum hin allmählich ab. Diese Fermentreaktionen sind im Zentrum des Implantats negativ. Die Succinodehydrogenase-Reaktion ist als einzige in der Randzone nur schwach in Form weniger kleiner, intraplasmatischer Granula positiv, im Zentrum dagegen zeigt sie in allen Zellen einen intensiv positiven Ausfall (Abb. 3 c, Abb. 4 c). Nach 24 Std. ist diese Aufgliederung voll entwickelt. Morphologisch sind zu diesem Zeitpunkt erstmals kleine Nekrosen und Leukocytenansammlungen an der Grenze zwischen der Außenzone und dem zentralen Anteil des Implantats nachweisbar. Im Bereich dieser Nekrosen sind alle Fermentreaktionen der Geschwulstzellen negativ. Die Leukocyten sind nur sehr schwach fermentpositiv. Sie sind gegen die Tumorzellen deutlich abzugrenzen.
Nach 48 Std. hat sich der nekrotische Saum deutlich ausgeprägt. Die weiterhin großzellige Randzone wird nun durch einen breiten Streifen von Leukocyten und nekrotischen Geschwulstzellen vom zentralen Anteil des Implantats getrennt. Wie im morphologischen

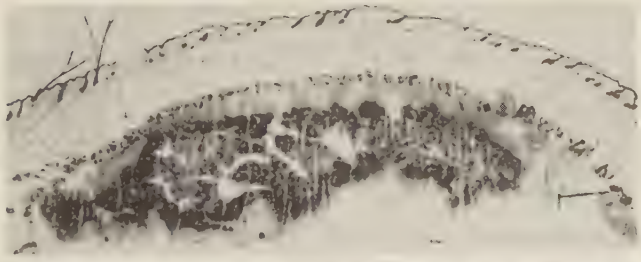
a



b



c



d

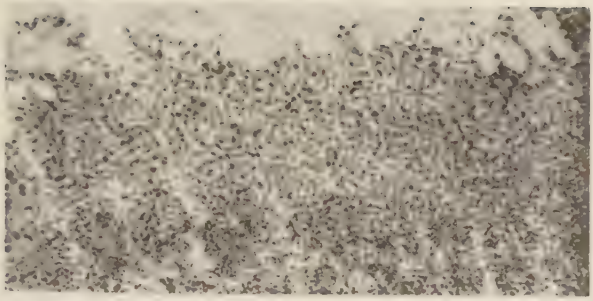
Abb. 3 a - d. Ehrlich'scher Tumor der Maus 21 Std. nach subcut. Implantation. a - H.E.-Färbung: Ringförmige Außenzone.
b - Lactatdehydrogenase: In der Außenzone starke Reaktion, Zentrum negativ.
c - Succinodehydrogenase: In der Außenzone sehr schwache Reaktion, Zentrum stark positiv.
d - α-Glycerophosphatdehydrogenase: Außenzone stärker, Zentrum schwach positiv. Vergr. 10 x .

Befund, so entsteht hierdurch auch im fermenthistochemischen Bild eine Dreiteilung. Die Außenzone zeigt weiterhin eine starke Lactatdehydrogenase-, Äpfelsäuredehydrogenase-, α-Glycerophosphatdehydrogenase- und DPN-Diaphorase-Reaktion. Die Succinodehydrogenasereaktion fällt hier nur sehr schwach positiv aus. Die Leukocyten- und Nekrosezone ist fermentnegativ. Im zentralen Anteil des Tumors bleibt ein leukocytenfreier Kern von kleinen Geschwulstzellen erhalten, die eine stark positive Succinodehydrogenasereaktion aufweisen, während die anderen untersuchten Fermentreaktionen völlig negativ sind.
Nach 3 Tagen ist das Bild durch das nun deutlich einsetzende solide Gewebswachstum gekennzeichnet. Die Randzone ist durch nach außen fortschreitendes Wachstum verbreitert. Die positiven Reaktionen für Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase bleiben jedoch auf einen stets gleich breiten äußeren Saum beschränkt. In soliden Gewebssprossen ist eine besonders starke Lactatdehydrogenasereaktion nachweisbar. Nach innen zu werden die Zellen kleiner, das Chromatingerüst der Zellkerne dichter. Zugleich nehmen die Reaktionen für die DPN-Diaphorase und die DPN-abhängigen Dehydrogenasen ab, und die Succinodehydrogenase-Reaktion ist stärker positiv. Es gehen also in der Randzone Veränderungen vor sich, wie sie nach 4 - 6 Std. den gesamten implantierten Zellhaufen betroffen hatten.

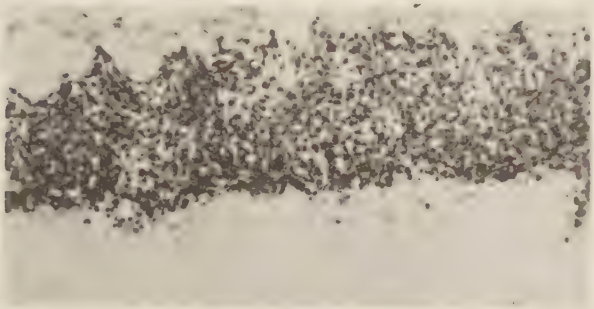
An die so aufgegliederte ehemalige Randzone schließt sich nach innen der ebenfalls verbreiterte Streifen nekrotischer Geschwulstzellen und Leukocyten an, in dem die Fermentreaktionen weiterhin negativ bleiben. Der leukocytenfreie Kern aus kleinen, nicht nekrotischen Succinodehydrogenase-positiven Geschwulstzellen hat sich weiter verkleinert. Es liegt also nun eine Vierschichtung vor, und zwar dadurch, daß sich die ursprüngliche Außenzone verbreitert hat und ihr innerer Anteil Veränderungen zeigt, wie sie anfangs im Geschwulstzentrum aufgetreten waren.

Zu späteren Zeitpunkten der Untersuchung, 5, 7 und 9 Tage nach der Implantation ist der schichtenweise Aufbau des Tumors wegen des zu-

a



b



c

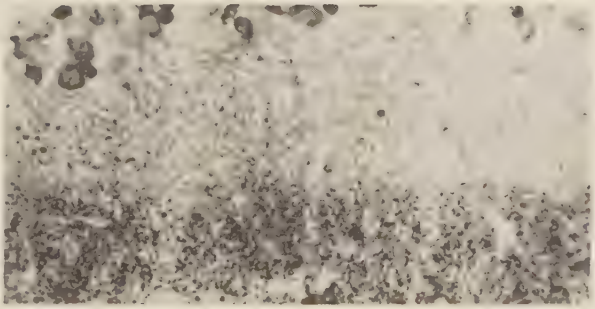


Abb. 4 a - c. Ausschnitt aus 3. a - H.E.-Färbung:

Die Außenzone ist großzellig, das Zentrum besteht aus kleinen Geschwulstzellen.

b - Lactatdehydrogenase: Die Reaktion ist scharf auf die Randzone begrenzt, das Zentrum ist negativ.

c - Succinodehydrogenase: Die Außenzone ist sehr schwach, das Zentrum stark fermentpositiv.

Vergr. 120 x

nehmenden Geschwulstwachstums nur noch teilweise erkennbar. Im Zentrum des Tumors liegen unregelmäßige, größere, leukocytenreiche Nester nekrotischer Geschwulstzellen. In diesen Anteilen, die keinerlei positive Reaktionen für die DPN-Diaphorase, Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase zeigen, ist in einzelnen Zellen an der Membran eine positive Succinodehydrogenase-Reaktion nachweisbar. Daneben finden sich auch Sprossen solid gelagerter Tumorzellen. Diese Sprossen sind meist um ein kleines Gefäß herum gelegen, in einer Dicke, die der Schichtdicke der großzelligen Außenzone in der Frühphase der Entwicklung der Geschwulst entspricht. Auch in ihrem Fermenthistochemischen Verhalten gleichen sie dieser. An der Peripherie der Geschwulst sind größere Gebiete regelrechten soliden Tumorgewebes entwickelt. In diesen in festem Verband liegenden Zellen sind die Reaktionen für die DPN-Diaphorase, Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase zwar in allen Zellen positiv, insgesamt aber schwächer geworden. Die Succinodehydrogenase-Reaktion ist in den soliden Geschwulstabschnitten schwach positiv. Das Fermentbild ist in diesen Gebieten also sehr gleichförmig geworden. Nur in einem schmalen Randsaum von Zellen, die zum Teil infiltrierend zwischen die umgebenden Muskelfasern wachsen, finden sich die ursprünglich starken, für die DPN-Diaphorase und die DPN-abhängigen Fermente charakteristischen Reaktionen.

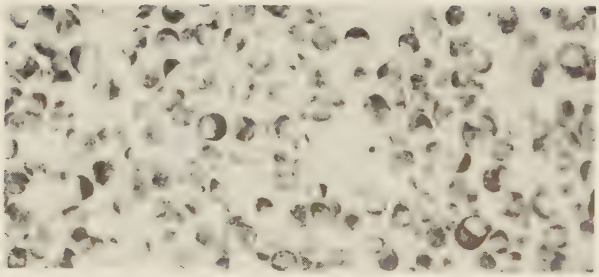
Analoge Untersuchungen wurden nach Heterotransplantation des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumors auf die Ratte durchgeführt. Es wurden 0,3 - 0,5 ml Tumorascites subcutan injiziert. 6 und 24 Std. nach der Implantation ergaben sich die gleichen Befunde wie bei der Maus.

Walker-Carcinom der Ratte.

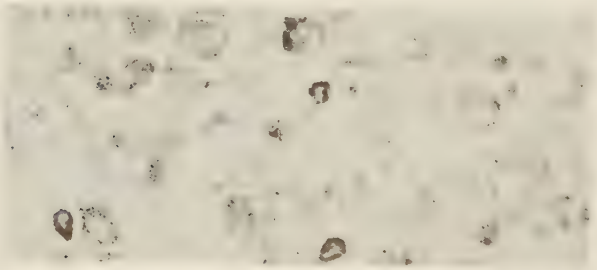
Die Veränderungen bei der subcutanen Implantation unterscheiden sich besonders in der verschiedenen Verteilung der Reaktionsstärken von den entsprechenden Befunden beim Ehrlich'schen

Mäuse-Ascites-Tumor.
Bei den Untersuchungen 5 min. - 3 Std. nach der subcutanen Injektion des Ascites zeigen auch hier alle im Ascites vorher negativen Geschwulstzellen eine schwach positive Lactatdehydrogenase-Reaktion. Es liegen also im Implantat massenhaft schwach Lactatdehydrogenase-positive neben wenigen sehr stark positiven Zellen (Abb. 5 b), im Gegensatz zu dem gleichmäßig stark fermentpositiven Bild beim Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor (Abb. 5 a). In diesem Stadium sind die Reaktionen für die Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase entweder völlig negativ oder sehr schwach positiv. Ein Unterschied zwischen schwächer und stärker reagierenden Zellen ist auch hier zu beobachten. Die Succinodehydrogenase-Reaktion fällt in allen Zellen gleichmäßig schwach aus.
Auch beim Walker-Carcinom der Ratte setzt nach 4 - 6 Std. eine Differenzierung in eine großzellige äußere und eine kleinzellige innere Zone ein. In der Außenzone nimmt die Reaktion auf Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase an Intensität zu. Der Unterschied zwischen stärker und schwächer fermentpositiven Geschwulstzellen bleibt jedoch auch 24 - 48 Std. nach der Implantation noch deutlich erhalten. Im Zentrum sind diese drei Fermente nicht mehr nachzuweisen. Nur die Succinodehydrogenase-Reaktion ist hier gleichmäßig stark, während sie in der Randzone nur schwach positiv ausfällt.
Im Gegensatz zum Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor tritt bereits nach 24 Std. eine dichte Leukocyteninfiltration an der Grenze zwischen der Außenzone und dem Zentrum des Tumors auf, die mit zunehmender Nekrose von Geschwulstzellen einhergeht. Auch im kleinzelligen Zentrum des Implantats finden sich vereinzelte Leukocyten.
Etwa 48 Std. nach der Implantation finden sich an der Peripherie die ersten soliden Zellverbände, die sich im Laufe der nächsten Tage zu großen soliden Geschwulstabschnitten ausbilden. Deren Randgebiete zeigen eine besonders stark positive

a



b



c

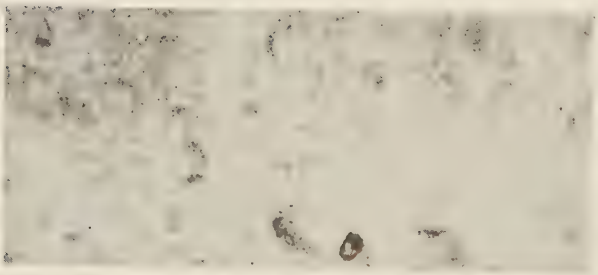


Abb. 5 a - c. Lactatdehydrogenase-Reaktion in Ascites-tumoren 5 min. nach subcutaner Implantation.

a - Ehrlich'scher Tumor: Alle Zellen zeigen eine starke Lactatdehydrogenase-Reaktion.

b - Walker-Carcinom der Ratte: Abstufung von vereinzelt starker bis zu schwächster Lactatdehydrogenase-Reaktion in den Geschwulstzellen.

c - Yoshida-Sarkom der Ratte: Die Reaktion entspricht in der Intensitätsverteilung derjenigen des Walker-Tumors.

Vergr. 470 x.

Fermentreaktion für DPN-Diaphorase, Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase. In den übrigen soliden Tumoranteilen zeigen die Fermentreaktionen nun eine sehr gleichmäßige Intensitätsverteilung. Die Reaktionen für alle untersuchten Fermente sind gleichmäßig schwach oder mittelstark positiv. Nur in einzelnen tubulären Sproßbildungen sind alle Reaktionen ausgesprochen stark. Das Verhalten des Tumors MR-RM entspricht völlig dem des CR.

Yoshida-Sarkom der Ratte.

Bei der subcutanen Implantation verhält sich dieser Tumor ähnlich dem Walker-Carcinom. Anfangs zeigen alle Zellen eine schwache Fermentreaktion beim Lactatdehydrogenase-, Äpfelsäuredehydrogenase- und α-Glycerophosphatdehydrogenase-Nachweis, dazwischen finden sich vereinzelt stärker fermentpositive Zellen (Abb. 5 c). Die Succinodehydrogenase fällt in allen Zellen gleichmäßig schwach aus. Dieses Bild erhält sich bis etwa 4 Std. nach der subcutanen Implantation. Auch hier besteht also ein deutlicher Unterschied zum Verhalten des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor. Ab 4 - 6 Std. nach der Übertragung ist auch Yoshida-Sarkom der Ratte eine morphologische und fermenthistochemische Zweiteilung zu beobachten. In der Außenzone bleibt der Unterschied zwischen Tumorzellen mit schwacher und solchen mit starker Fermentreaktion erhalten. Unverändert schwach bleibt in der Randzone auch die Succinodehydrogenase-Reaktion erhalten. In den Geschwulstzellen des Implantatzentrums dagegen hat diese Reaktion nun gleichmäßig an Intensität zugenommen. Auch in der weiteren Entwicklung verhält sich also diese Geschwulst ähnlich dem Walker-Carcinom der Ratte, doch fallen die Fermentreaktionen insgesamt schwächer aus.
Nach 24 Std. hat sich zwischen dem Randsaum und dem Zentrum der Geschwulst ein breiter Leukocytenstreifen entwickelt. Solides Gewebswachstum ist im Yoshida-Sarkom der Ratte erstmals zwischen dem 2. und 3. Tag zu beobachten. Die DPN-Diaphorase sowie die Dehydrogenasen einschließlich der Succinodehydrogenase sind schwach

und ziemlich gleichförmig in allen lebenden Geschwulstzellen nachweisbar.

C. Modellversuche.

Die soliden Geschwulstimplantate wurden, wie oben beschrieben, vor der Behandlung mit dem jeweiligen Incubationsmedium mit Kohlensäureschnee gefroren und im Kryostaten bei -20 Grad C geschnitten, während der Tumor-Ascites der Incubationslösung ohne diese Vorbehandlung ausgesetzt war. Die anfangs beschriebenen histochemischen Befunde an Ascites-Tumoren und die Beobachtungen des fermenthistochemischen Verhaltens des Tumor-Implantats während der Entwicklung der soliden Geschwulst sind wegen dieses Unterschiedes in der Methodik nicht direkt vergleichbar.
Es wurden daher Ehrlich'sche-, Walker- und Yoshida-Ascites-Tumoren jeweils nach der gleichen Vorbehandlung wie die subcutan überimpften Tumor-Implantate auf ihre Lactatdehydrogenase-Reaktion untersucht.

Ehrlich'sche Mäuse-Ascites-Tumoren.

Die Geschwulstzellen von 5 untersuchten Tumoren sind nach der routinemäßig am Ascites angewandten Untersuchungsmethode zu durchschnittlich 13,1 % (4,4 - 26,2) stark Lactatdehydrogenase-positiv. Bei einer Paralleluntersuchung, bei der das Zentrifugat des Ascites-Tumors vor der Incubation mit Kohlensäureschnee gefroren und 30 min. im Kryostaten gelagert wurde, sind in 4 Fällen 90 - 100 %, in einem Fall 60 % der Zellen deutlich positiv. Bei einer längeren Lagerung im Kryostaten bis zu 60 min. nimmt die Reaktion etwas an Intensität zu, um sich bei längerer Kälteeinwirkung, 2 Std. bis zu 48 Std., nicht mehr zu verändern.

Walker-Carcinom der Ratte.

Die Befunde entsprechen weitgehend denen am Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor. 5 Tumoren, die zunächst eine positive Lactatdehydro-

genase-Reaktion in 9,4 % (4,5 - 18) der Zellen zeigen, sind bei der Untersuchung nach der oben beschriebenen Kältevorbehandlung in 4 Fällen 90 - 100 %, in einem Fall 66 % Lactatdehydrogenase-positiv. Im Unterschied zum Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor ist hier die Lactatdehydrogenase-Reaktion nicht in allen Zellen gleich stark positiv, sondern das Reaktionsbild ist durch starke Intensitätsschwankungen gekennzeichnet.

Yoshida-Sarkom der Ratte.

Bei diesem Tumor lassen sich ähnliche Abhängigkeiten der Lactatdehydrogenase-Reaktion von der Kältevorbehandlung beobachten. Auch hier erhöht sich die Zahl der Lactatdehydrogenase-positiven Zellen bis zu 90 - 100 %. Die Reaktion erscheint ungleichmäßig schwach.

Bei der Untersuchung von Ehrlich'schen- und Walker-Ascites-Tumoren, die 1 Tag und länger in gefrorenem Zustand gelagert worden waren, wurde beobachtet, daß sich bereits 30 sec. nach der Zugabe des Lactatdehydrogenase-Incubationsmediums zum Ascites das Reaktionsgemisch im Sinne einer positiven Reaktion stark blau verfärbt. In sofort entnommenen Proben sind bis zu 100 % der Ascites-Tumor-Zellen schwach positiv.

In Einzelversuchen am Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor und am Walker-Carcinom der Ratte wurde beobachtet, daß nach einer Kältevorbehandlung von 30 min. bis zu 48 Std. auch die Succinodehydrogenase-Reaktion in annähernd 100 % aller Ascites-Tumor-Zellen ungleichmäßig positiv ausfällt.

V. Besprechung.

Seit den Arbeiten von Löwenthal und Jahn (35) gehören Ascites-Tumoren zu den meistverwandten Studienobjekten der experimentellen Geschwulstforschung (9, 10, 24, 27, 32, 34, 36, 37, 40, 49,

60, 61, 62, 63, 64, 65). Die Aktivität von Dehydrogenasen ist mit histochemischen Methoden an soliden (22, 41, 55) und an Ascites-Tumoren (2, 27) vereinzelt untersucht worden. Es fehlen jedoch vergleichende Untersuchungen über die morphologischen und fermenthistochemischen Verhältnisse in der Frühphase der Entwicklung solider Geschwülste aus Ascites-Tumoren.

Die Befunde am Ascites lassen keine Beziehungen zwischen dem Alter des Ascites-Tumors und dem Ausfall der Fermentreaktion erkennen. Auch die Mitosezahl und die jeweilige Zahl der fermentpositiven Zellen stehen in keinem erkennbaren Verhältnis zueinander. Das auffallende Phänomen, daß im gleichen Tumor fermentpositive neben eindeutig negativen Zellen zu finden sind, erhält also von hier keine Erklärung.
Moore und Wroblewski (42) beschreiben dagegen eine Abhängigkeit der Lactatdehydrogenase-Aktivität vom Zellwachstum.

Bedeutsam erscheint die Tatsache, daß sich die fermenthistochemischen Bilder der einzelnen Tumorstämme voneinander unterscheiden. Während in allen untersuchten Tumoren gleitende Übergänge der Reaktionen für die DPN-Diaphorase und die Succinodehydrogenase in den Zellen zu beobachten sind, fand sich bei den Reaktionen der untersuchten DPN-abhängigen Fermente folgende Besonderheit. Regelmäßig zeigen im Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor eine Anzahl von Zellen gleichmäßig starke und eindeutig positive Reaktionen für die Lactatdehydrogenase und Äpfelsäuredehydrogenase. Die α-Glycerophosphatdehydrogenase ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Boxer und Shonk (3) schwächer, allerdings eindeutig nachweisbar. Darüberhinaus sind alle Zellen völlig negativ. Beim Ascites-Tumor des Walker-Carcinom der Ratte fehlt diese klare Trennung. Neben eindeutig negativen und stark positiven Zellen finden sich stets solche, in denen die Reaktionen zwar positiv, jedoch nur sehr schwach sind. Typisch für das Yoshida-Sarkom sind neben negativen Zellen nur schwach positive Reaktionen auf Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase und einzelne stärker positiv gezeichnete Zellen.

Auch im histochemischen Verhalten in der Frühphase der soliden Geschwulstentwicklung fanden sich entsprechende Verhältnisse. Beim Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor zeigten alle Geschwulstzellen des Implantats eine stark positive Reaktion für Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase. Weder beim Walker-Carcinom noch beim Yoshida-Sarkom der Ratte war die positive Reaktion in allen Zellen so gleichmäßig stark. Die am Ascites beobachtete Differenz zwischen starken, schwächeren und nunmehr nicht mehr negativen, sondern schwach positiven Geschwulstzellen fand sich auch hier (Abb. 5).

Überraschend war die Beobachtung, daß bei den nach Kältevorbehandlung untersuchten Tumor-Asciten und bei allen subcutanen Implantaten, die ja bei der technischen Aufarbeitung der gleichen Kälteeinwirkung unterworfen waren, jeweils 90 - 100 % der Zellen Lactatdehydrogenase- und Succinodehydrogenase-positiv reagierten.

Daß der stärkere Ausfall der histochemischen Reaktionen nach der Implantation auf einer echten Vermehrung der Fermentaktivitäten, evtl. durch Einflüsse vom Wirtsorganismus beruht, ist schon wegen der kurzen Zeitspanne, in der dieser Umschlag eintritt, unwahrscheinlich. Die Änderung des fermenthistochemischen Verhaltens der Geschwulstzelle muß als Ausdruck einer Veränderung der Zellmembranen durch die Kälteeinwirkung angesehen werden, in dem Sinne, daß die Permeabilität für einen oder mehrere Stoffe des Incubationsmediums gesteigert ist. Die histochemischen Abweichungen der einzelnen Tumorstämme weisen demnach auf Unterschiede im Verhalten der Zellmembranen hin. Gegenüber dem Walker-Carcinom und dem Yoshida-Sarkom scheint der Ehrlich-Mäuse-Ascites-Tumor eine Sonderstellung einzunehmen.

Diese Befunde sprechen im Sinne des von Yoshida (65) eingeführten Begriffs der Individualität der einzelnen Geschwulst.

Die Beobachtungen über eine besondere Beeinflußbarkeit der Zellmembranen des Ehrlich'schen Ascites-Tumors stehen im Einklang mit

den Befunden von Wrba, Rabes, Schneider und Kageyama (62), daß unter dem Einfluß des Serums teilhepatektomierter Ratten die Phosphataufnahme der Zellen dieses Tumors ansteigt, die anderer untersuchter Tumoren dagegen sinkt.
Kuschnarew und Blagoweschtschenski (33) fanden, daß die Succinodehydrogenase-Aktivität von Bacterium coli in bei -40° C gefriergetrocknetem Gewebe durch aktivierende oder hemmende Stoffe weniger beeinflußt wird als in frischem Gewebe. Eine gegenüber in letzterem verstärkte Succinodehydrogenase-Reaktion in gefriergetrocknetem Gewebe beschreiben sie nicht.

Ob weitere physikalische oder chemische Faktoren bei diesen Unterschieden der Dehydrogenase-Aktivitäten eine Rolle spielen, muß dahingestellt bleiben. So beobachteten Capobianco und Ruffo (5) eine Hemmung der Zellatmung durch die Ascitesflüssigkeit des Ehrlich'schen Tumors. Ibsen, Coe und Mc Kee (25) beschreiben eine Abhängigkeit der Glykolyse in Ehrlich'schen Ascites-Tumorzellen von der Konzentration anorganischen Phosphates in der Waschflüssigkeit oder im Incubationsmedium.

Bei allen drei Geschwülsten fand sich, daß nach der subcutanen Implantation die Ascitesflüssigkeit in das subcutane Bindegewebe gepreßt wird. Die Hauptmasse der Geschwulstzellen ist in einem Knoten dicht zusammengelagert. Nach 2 - 3 Tagen finden sich die ersten Anzeichen eines soliden Gewebswachstums. An den Geschwulstzellhaufen, und zwar nur an den größeren Tumorzellgruppen, nicht an kleineren, etwa im Bereich des Stichkanals, treten in der Folge regelmäßig morphologische und fermenthistochemische Veränderungen auf. 4 - 6 Std. nach der Implantation bildet sich eine scharf abgegrenzte Randzone. Sie ist nach 24 Std. voll entwickelt und teilweise noch nach 48 Std. nachweisbar. Diese Außenschicht besteht aus großen Geschwulstzellen mit großem Zellkern und reichlichem Protoplasma. Sie zeigt eine intensive DPN-Diaphorase-Reaktion, die gegen das Zentrum nicht scharf abgesetzt ist und eine scharf abgegrenzte Reaktion für Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase und α-Glycerophosphatdehydrogenase. Die Intensität

der Fermentreaktionen in dieser Außenzone ist zwischen den verschiedenen Tumorstämmen unterschiedlich. Sie entspricht jeweils völlig dem Bild, das der gesamte Knoten direkt nach der Implantation zeigte.

Die Lage an der Peripherie der Geschwulst, die gleichmäßige Dicke und die scharfe Abgrenzung dieser Zone weisen darauf hin, daß ihre Entwicklung mit der Stoffzufuhr aus der Umgebung zusammenhängt, es sich also hier um ein Grenzschichtdickenphänomen handelt. Eine bestimmte kritische Gewebsdicke wirkt in Abhängigkeit von der Diffusionsgröße stoffwechselbegrenzend. Die gleiche Grenzschicht hat sich bei der Heterotransplantation des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumors auf die Ratte gebildet. Diese Deutung wird durch die Beobachtung gestützt, daß in einem Geschwulstzellknoten, durch dessen Zentrum ein Nerv mit seinem gefäßreichen Perineurium zieht, um diesen Nerven herum eine der Außenzone gleiche Schicht von Zellen mit entsprechendem morphologischen und histochemischen Verhalten ausgebildet ist.

Auffällig ist, daß in der Außenzone die Succinodehydrogenase-Reaktion relativ schwach ist, während sie im Zentrum der Geschwulst stark ausfällt. Es besteht also ein gegensätzliches Verhalten der DPN-abhängigen Fermente, deren Nachweis die Anwesenheit von DPN-Diaphorase erfordert und der Succinodehydrogenase, bei der die Wasserstoffübertragung auf die als Reduktionsindikator benutzten Tetrazoliumsalze direkt und nicht über die Diaphorasen erfolgt. Weil die Diaphorase nur in der Randzone nachzuweisen ist, erhebt sich die Frage, ob der negative Ausfall der histochemischen Reaktion für Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase, α-Glycerophosphatdehydrogenase im Geschwulstzentrum auf ein echtes Fehlen dieser Fermente zurückzuführen ist, oder ob zum Beispiel Lactatdehydrogenase vorhanden ist, sich aber wegen des Fehlens der DPN-Diaphorase dem Nachweis entzieht. Dagegen spricht die Tatsache, daß histochemisch die Diaphorase-Reaktion schwach in den Rand des Geschwulstzentrums hineinreicht, während die DPN-abhängigen Fermente scharf auf die Randzone begrenzt sind (Abb. 3 und 4). Es besteht die Möglichkeit, daß die schichtweise, gegensätzliche Anordnung der Fermente im Zusammenhang mit

einem stoffwechselbedingten DPN-Mangel im Geschwulstinnern steht. An sudangefärbten Präparaten wurde ausgeschlossen, daß eine schichtweise Anordnung bestimmter Fermentreaktionen durch Lipoidlösung des Reaktionsindikators in verfetteten Geschwulstzellen vorgetäuscht wird.

In Übereinstimmung mit Beobachtungen von Friede (18, 19) wurde eine inverse Beziehung zwischen fettiger Degeneration und Succinodehydrogenase-Aktivität gesehen.

Von Schumacher (50) wurde im Leberläppchen in Abhängigkeit vom Sauerstoffgefälle eine starke Aktivität der Succinodehydrogenase an der Läppchenperipherie, der DPN-Diaphorase im Zentrum beschrieben.

Im Zentrum der Geschwulst zeigen die Zellen, besonders beim Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor, einen schmalen Cytoplasmasaum um kleine Kerne mit zartem Chromatingerüst, größeren Nucleolen und vereinzelt auch Mitosen. Nach 24 Std. sind beim Ehrlich'schen Ascites-Tumor die ersten Nekrosen und Leukocyteninfiltrate nachweisbar, schmal und scharf auf die Grenze zwischen Geschwulstzentrum und Randzone beschränkt. Beim Walker-Carcinom und beim Yoshida-Sarkom der Ratte treten diese Veränderungen schon früher und wesentlich stärker auf. Dadurch entsteht eine Dreischichtung, die am klarsten beim Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumor ausgeprägt ist. Auch dieses Schichtphänomen scheint Auswirkung gewisser Stoffwechselwirkungen der Umgebung zu sein. Fermenthistochemisch tritt eine weitere Differenzierung durch das Wachstum der Außenzone ein und eine neuerliche Zweischichtung, wie sie anfangs im Zentrum des Implantats vorlag. Das ursprüngliche Geschwulstzentrum bleibt in einem innersten Kern noch immer frei von Nekrosen.

Die morphologischen und histochemischen Veränderungen der einzelnen Zellen und damit ihre Beteiligung am soliden Geschwulstwachstum erweisen sich durch diese Beobachtungen als von den Stoffwechselbedingungen der Zelle abhängig, die durch die zufällige Lage innerhalb des implantierten Geschwulstzellhaufens bestimmt ist. Eine genetisch fixierte Selektion der Zellen, die zum Ge-

schwulstwachstum auch nach der Transplantation befähigt sind, wie sie umgekehrt nach Makino (36, 37), Makino und Kano (38), Klein und Klein (27), Schümmelfeder (49) bei der Überführung einer soliden Geschwulst in die Ascites-Form vor sich geht, findet hier wohl nicht statt.
Die beschriebenen Schichtungen treten nach dem Eintritt soliden Geschwulstwachstums zurück. Die nunmehr gleichförmig schwächeren Fermentreaktionen erweisen sich als diffus über das gesamte Cytoplasma verteilte fermentpositive Granula. Nach unseren heutigen Kenntnissen entsprechen diese Granula den Mitochondrien. Elektronenoptische Untersuchungen von Wessel und Bernhard (60) zeigten, daß Zellen solider Geschwülste, die aus Ascites-Tumor-Zellen entstanden, eine ungewöhnlich starke Entwicklung des Ergastoplasmas und der Mitochondrien aufweisen. Im Gegensatz hierzu finden sich elektronenoptisch in Ascites-Tumor-Zellen nur kleine degenerierte Mitochondrien. Starke histochemische Fermentreaktionen sind vorwiegend im Bereich der Zellmembran nachweisbar. Ähnliche Enzymreaktionen an der Zellmembran wurden von Gropp, Bontke und Hupe (22) beschrieben.

VI. Zusammenfassung.

Das fermenthistochemische Verhalten der Geschwulstzellen des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Tumors zeigt Unterschiede zum Walker-Carcinom bzw. Yoshida-Sarkom. Die positiven Reaktionen für die DPN-Diaphorase und die DPN-abhängigen Dehydrogenasen fallen im Ehrlich'schen Ascites-Tumor in der Ascites- und in der soliden Form am stärksten und gleichmäßigsten aus. Im Transplantat aller drei Tumoren entwickelt sich nach 6 - 24 Std. eine großzellige Aussenzone mit positiven Reaktionen für die DPN-Diaphorase und die DPN-abhängigen Dehydrogenasen. Im kleinzelligen Zentrum sind diese Reaktionen negativ. Die Succinodehydrogenase verhält sich entgegengesetzt. Nekrosen und Leukocytenansammlungen bleiben auf den Rand des Geschwulstzentrums beschränkt. Durch Einfrieren der Ascites-Tumorzellen steigt die Zahl der Lactatdehydrogenase-positiven Zellen entsprechend den Befunden an Kryostatschnitten bis

auf 100 % an, am gleichmäßigsten wieder beim Ehrlich'schen Tumor. Ein besonderes Membranverhalten der Ehrlich'schen Ascites-Tumorzellen wird diskutiert.

VII. Literaturverzeichnis.

1 Atkisen, E., Melvin, S. and Fox, S.W.: Some properties of 2,3,5 triphenylterazolium chloride and several iodo derivates. Science 111, 385 (1950)

2 Birns, M.: The biochemical cytology of an ascites hepatoma. Exp.Cell Res. 22, 317 (1961)

3 Boxer, G.E. and Shonk, C.E.: Low levels of soluble DPN-linked α-glycerophosphatase dehydrogenase in tumors. Cancer Res. 20, 85 (1960)

4 Breusch, F.L.: Die quantitativen Verhältnisse von Fumarase und Succino-Dehydrase in verschiedenen Geweben. Biochem.Z. 259, 101 (1938)

5 Capabianco, G. und Ruffo, A.: Identificazione di un inhibitore della respirazione cellulare nel liquido ascitico di Ehrlich. Bol.Soc.ital.Biol.sper. 35/24, 2187 (1959)

6 Crabtree, H.G.: Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. Biochem.J. 23, 536 (1929)

7 Dean, W., Barnett, R.J. and Seligman, A.M.: Kontrollreaktionen zum Succinodehydrogenasenachweis. In Handbuch der Histochemie, W. Graumann und K.H. Neumann, Bd. 4, 1. Teil Gustav Fischer - Verlag, Stuttgart (1960)

8 Dickens, F. and Simers, F.: The metabolism of normal and tumour tissue. II.The respiratory quotient and the relationship to glykolysis. Biochemic J. 24, 1301 (1930)

Earle, W.R.: Study of Walker rat carcinoma 256 in vivo and in vitro.
Am.J.Cancer 24, 566 (1935)

Eder, M., Schauer, A. und Wrba, H.: Zur Aktivität bestimmter Dehydrasen in verschiedenen Impftumoren der Ratte.
Naturwissenschaften 47, 475 (1960)

Eder, M., Wrba, H., Versmold, H. und Schauer, A.: Histochemische Untersuchungen zur Verteilung von Dehydrasen bei der Übertragung von Impftumoren in solide Geschwülste.
Naturwissenschaften 48, 481 (1961)

Eder, M. und Wrba, H.: Fermenthistochemische Untersuchungen zur Biologie von Aszitestumoren und ihrer Umwandlung in solide Geschwülste.
Z.Krebsforschg. 64, 335-365 (1961)

Elliot, K.A.C., Benoy, M.P. and Baker, Z.: The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumour tissues. II. Rat kidneys and transplantable tumours.
Biochem. J. 29, 1937 (1935)

Euler, H.v., Adler, E. und Günther, G.: Vergleichende Studien über Dehydrasesysteme im Muskel und Jensen-Sarkom der Ratte.
Hoppe-Seylers Z. 247, 65 (1937)

Farber, E., Sternberg, W.H. and Dunlap, C.E.: Histochemical localisation of specific oxydative enzymes. I. Tetrazolium stains for diphosphopyridine nucleotid diaphorase and triphosphopyridine nucleotid diaphorase.
J. Histochem. Cytochem. 4, 254 (1956)

Farber, E., Sternberg, W.H. and Dunlap, C.E.: Histochemical localisation of specific oxydative enzymes. III. Evaluation studies of tetrazolium staining methods for diphosphopyridine nucleotid diaphorase, triphosphopyridine nucleotid diaphorase and the succindehydrogenase system.
J. Histochem. Cytochem. 4, 347 (1956)

17 Fisher, E.R. and Fisher, B.: Electron microscopic, histologic and histochemic features of the Walker carcinoma.
Cancer Res. 21, 527 (1961)

18 Friede, R.L.: Histochemischer Nachweis von Succinodehydrogenase in Biopsien menschlicher Hirngewebe.
Virchows Arch. path. Anat. 332, 216 (1959)

19 Friede, R.L.: Inverse histochemical distribution of fat and oxydative enzymes in fat livers produced by C Cl_4
J. Pathol. Bacteriol. 79, 109 (1960)

20 Greenstein, J.P.: The biochemistry of malignant tissues.
Ann. Rev. Biochem. 14, 643 (1945)

21 Greenstein, J.P. and Meister, A.: Tumor Enzymology. In Summer, J.B. and Myrbäck, K. eds.: The enzymes, chemistry and mechanismus of action. Vol.2, pt.2, New York, Academic Press 1952, 1131

22 Gropp, A., Bontke, E. und Hupe, K.: Fermenthistochemische Untersuchungsmethoden an Fibroblasten und Sarkomgeweben in vitro.
Z.Krebsforsch. 62, 170 (1957)

23 Hess, R., Scarpelli, D.G. and Pearse, A.G.E.: The cytochemical localisation of oxydative enzymes. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 4, 753 (1958)

24 Hirono, J.: Histochemical demonstration of dehydrogenase in ascites tumor cells.
Stain Technol. 32, 39 (1958)

25 Ibsen, K.H., Coe, E.L. and Mc Kee, R.W.: Some factors influencing respiration and glykolysis in Ehrlich ascites tumor cells.
Cancer Res. 20, 1399 (1960)

26 Jensen, C.O., Sacks, W. and Baldauski, F.A.: The reduction of triphenylterazolium chloride by dehydrogenases by corn embryos.
Science 113, 65 (1951)

Klein, G. and Klein, E.: Conversion of solid neoplasmas into ascites tumors.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 63, 640 (1956)

Kuhn, R. und Jerchel, D.: Über Invertseifen, VII. Mitteil.: Tetrazoliumsalze.
Ber.chem.Ges. 74B, 941 (1941)

Kuhn, R. und Jerchel, D.: Über Invertseifen, VIII. Mitteil.: Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen.
Ber.chem.Ges. 74B, 949 (1941)

Kun, E.: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase.
Proc.Soc.exper.Biol. and Med. 78, 159 (1951)

Kun, E. and Abood, L.G.: Colometric estimation of succinic dehydrogenase by triphenylterazolium chloride.
Science 109, 144 (1949)

Kun, E., Talalay, P. and Williams-Ashman, H.G.: Studies on the Ehrlich ascites tumor. I. The enzymatic and metabolic activities of the ascitic cells and the ascitic plasma.
Cancer Res. 11, 1855 (1951)

Kuschnarew, W.M. und Blagoweschtschenski, W.A.: Einfluß der Gefriertrocknung auf die Succinodehydrogenaseaktivität von Bakterium coli.
Biochemie (Moskau) 25, 599 (1960)

Lettré, H.: Das Yoshida-Sarkom der Ratte. Nach Arbeiten von T. Yoshida zusammengestellt.
Z.Krebsforsch. 59, 68 (1953)

Loewenthal, H. und Jahn, G.: Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuse-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen.
Z.Krebsforsch. 37, 439 (1932)

36 Makino, S.: Cytological studies on the Yoshida sarcoma of rat.
Chromosoma 4, 649 (1952)

37 Makino, S.: Further influences favouring the concept of stem cell in ascites tumors in rats.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 63, 640 (1956)

38 Makino, S. and Kano, K.: Cytological studies of tumors.
J.Nat. Cancer Inst. 15, 1165 (1955)

39 Meister, A.: Lactic dehydrogenase activity of certain tumors in normal tissues.
J.Nat. Cancer Inst. 10, 1263 (1950)

40 Michaelson, S. and Orcutt, J.A.: Observation of some groth-characteristics of the Walker carcinoma 256.
Cancer 10, 416 (1957)

41 Monis, B. Nachlas, M.M. and Seligman, A.M.: Histochemical study of 3 dehydrogenase systems in human tumors.
Cancer (Philad.) 12, 1238 (1958)

42 Moore, A.E. and Wroblewski, F.: Lactic dehydrogenase production in tissue culture of normal, transformed and malignant human cell lines.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 98, 782 (1958)

43 Nachlas, M.M., Tsou, K.C., de Souza, E., Cheng, C.S. and Seligman, A.M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole.
J. Histochem. Cytochem. 5, 427 (1957)

44 Nachlas, M.M., Walker, D. and Seligman, A.M.: A histochemical method for the demonstration of DPN-Diaphorase.
J. Biophys.Biochem.Cytol. 4, 29 (1958)

45 Pearse, A.G.E.: Histochemistry.
London: Churchill 1960

6 Pechman, H.v. und Runge, P.: Oxydation der Formazylverbindungen.
Ber.chem.Ges. 27, 2920 (1894)

7 Rutenburg, A.M., Gofstein, R. and Seligman, A.M.: Preparation of a new tetrazolium salt which yields blue pigment on reduction and its use in the demonstration of enzymes in normal and neoplastic tissues.
Cancer Res. 10, 113 (1950)

8 Scarpelli, D.G., Hess, R. and Pearse, A.G.E.: The cytochemical localisation of oxydative enzymes.
J. Biophys.Biochem.Cytol. 4, 747 (1958)

9 Schümmelfeder, N.: Der adaptive Differenzierungsverlust von Geschwulstzellen bei der Entstehung eines Ascitestumors.
Naturwissenschaften 10, 232 (1954)

0 Schumacher, H.H.: Histochemical distribution pattern of respiratory enzymes in the liver lobule.
Science 125, 501 (1957)

1 Seligman, A.M. and Rutenburg, A.M.: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase.
Science 113, 317 (1951)

2 Shelton, E. and Schneider, W.C.: On the usefulness of tetrazolium salts as a histochemical indicator of dehydrogenase activity.
Anat.Rec. 112, 61 (1952)

3 Shelton, E. and Rice, M.E.: Comparison of the reduction of two tetrazolium salts with succinoxydase activity of tissue homogenates.
J.Nat.Cancer Inst. 18, 117 (1957)

4 Sternberg, W.H., Farber, E. and Dunlap, E.: Histochemical localisation of specific oxydative enzymes, II. Localisation of diphosphopyridine nucleotide and triphosphopyridine nucleotid diaphorases and the succinic dehydrogenase system in the kidney.
J.Histochem.Cytochem. 4, 266 (1956)

55 Stolk, A.: Histochemical analysis of 3 dehydrogenase systems in the renal adenocarcinoma of Aplocheilus lineatus. Naturwiss. 47, 188 (1960)

56 Straus, S.H., Cherosis, N.O. and Straus, E.: Demonstration of reducing enzyme systems in neoplasms and living mammalian tissues triphenyltetrazolium chloride. Science 108, 113 (1948)

57 Tsou, K.C., Cheng, C.S., Nachlas, M.M. and Seligman, A.M.: Syntheses of some p-nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenases. J.Am.Chem.Soc. 78, 6139 (1956)

58 Warburg, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Julius Springer-Verlag, Berlin (1926)

59 Wenner, C.E., Spirtes, M.A. and Weinhouse, S.: Metabolism of neoplatic tissue. II. A survey of enzymes of the citric acid cycle in transplanted tumors. Cancer Res. 12, 44 (1952)

60 Wessel, W. und Bernhard, W.: Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen von Ehrlich- und Yoshida-Ascites-Tumorzellen. Z.Krebsforsch. 62, 140-162 (1957)

61 Wrba, H. und Rabes, H.: Die Entstehung stabiler colchizinresistenter Stämme von Impfgeschwulsten durch heterologe Passagen auf Goldhamstern. Z.Krebsforsch. 64, 348 (1961)

62 Wrba, H., Rabes, H., Schneider, L.V. und Kageyama, R.: Die spezifische Wirkung von Serum teilhepatektomierter Ratten auf Tumorzellen in vitro. Z.f.Krebsforsch. 64, 278 (1961)

63 Wrba, H. und Ripoll-Gomez, M.: (a) Die cytologische Analyse des spontan heterotransplantablen Stammes MR-RM des Walker-Tumors in Ascitesform. Z.Krebsforsch. 63, 439-446 (1960)

64 Wrba, H. und Ripoll-Gomez, M.: (b) Zur Biologie des heterolog wachsenden Yoshida-Sarkoms (Stamm MY-RY). Z.Krebsforsch. 63, 570-585 (1960)

65 Yoshida, T.: Studien über das Ascites-Hepatom. Zugleich ein Beitrag zum Begriff der zellulären Autonomie einerseits, und der Individualität der einzelnen Geschwulst andererseits. Virchows Arch. path.Anat. 330, 85 (1957)

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Max Eder danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

VIII. Lebenslauf

Am 18. Mai 1937 wurde ich als ältestes von vier Kindern des praktischen Arztes, Dr. med. Heinrich Versmold und seiner Ehefrau Dorothea, geborene Tolsdorff, in Gotha/Thür. geboren. Dort besuchte ich die Reiher-Volksschule bis zum 7. Schuljahr.

Im Herbst 1948 floh unsere Familie aus der Sowjetzone nach Münster/Westf.. Hier besuchte ich das neusprachliche Wilhelm-Hittorf-Gymnasium, an dem ich am 13.3.1957 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1957 begann ich an der Universität Münster das Studium der Medizin. Im 3. Fachsemester, dem Sommersemester 1958, wechselte ich zur Universität Tübingen, kehrte im 4. Semester nach Münster zurück. Nach dem 5. vorklinischen Semester legte ich hier am 29.10.1959 die ärztliche Vorprüfung mit der Gesamtnote "gut" ab.

Im 1. klinischen Semester, dem Wintersemester 1959/60, studierte ich an der Faculté de Médecine in Paris, im 2. klinischen Semester in Münster/Westf.. Seit meinem 3. klinischen Semester, dem Wintersemester 1960/61 bin ich an der hiesigen Ludwig-Maximilian-Universität immatrikuliert. Ich stehe im 6. klinischen und 11. Fachsemester und beabsichtige, mich in diesem Sommer zum medizinischen Staatsexamen zu melden.